

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Telaah Pustaka

##### 1. Tumbuhan Kelubut

###### a. Klasifikasi Tumbuhan



Gambar 2. 1 Tumbuhan Kelubut (*Passiflora foetida* L.)  
(gambar; sumber primer)

Tumbuhan kelubut memiliki kedudukan dalam sistematika tumbuhan (Taksonomi) seperti berikut :

- Kingdom : Plantae
- Divisi : *Spermatophyta*
- Sub Divisi : *Angiospermae*
- Kelas : *Dicotyledoneae*
- Ordo : *Malpighiales*
- Famili : *Passifloraceae*
- Genus : *Passiflora*
- Spesies : *Passiflora foetida* L. (Mulyani, 2019).

**b. Sinonim Tumbuhan**

Tumbuhan kelubut ini memiliki nama yang berbeda untuk setiap daerahnya, antara lain, tanaman rombusa, gegambo, lemanas, remugak (Sumatera), kaceprek, kileuleueur, permot, pacean, tajutan, ceplukan blungsung (Jawa), bungan putir, moteti, buah pitri (Nusa Tenggara), cemot (Palangkaraya), Kelubut, Keleng (Kalimantan Timur) (Noorcahyati, 2012 ; Mulyani, 2019). Tumbuhan ini memiliki buah yang dikenal dengan berbagai nama setiap daerah diantaranya ceplukan blungsun, senthiet (Jawa), permot, rajutam, kaceprek atau ki leuleu'eur (Sunda), kambuik kambuik (Minangkabau), dan timun dendan atau timun padang (Melayu).

**c. Deskripsi Tumbuhan**

Tumbuhan Kelubut (*Passiflora foetida* L.) tumbuh di daerah tropis dan biasanya ditemukan merambat dengan panjang 1,5-6 m pada tanaman lainnya. Tumbuhan ini memiliki batang berbentuk silindris, yang ditumbuhi dengan rambut – rambut tebal buahnya yang berukuran kecil dan berwarna kuning terang jika telah matang, terlihat seperti dibungkus oleh selaput bulu (Asir *et al.*, 2014).

**d. Kandungan Kimia**

Menurut Asir *et al.* (2014) menyimpulkan kalau daun kelubut memiliki kandungan alkaloid, tanin, steroid, saponin dan Flavonoid. Menurut Noviyanti *et al.*, (2014) Alkaloid, steroid, dan triterpenoid merupakan contoh bahan kimia metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak daun kelubut (*Passiflora foetida* L). Lade *et al.*, (2017) telah melaporkan bahwa tanaman *Passiflora foetida* L mengandung berbagai komponen fitokimia, antara lain alkaloid, fenol, glikosida, flavonoid, senyawa sianogenik, passifloricin, polipeptida, alfa-pyoron, tetrafilin A, tetrafilin B sulfat, deidacin, dan volkenin, yang berpotensi mempengaruhi kesehatan manusia.

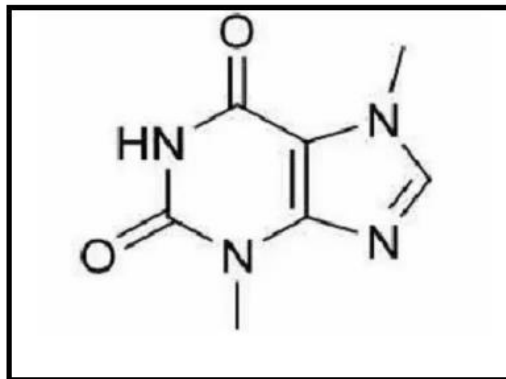
Di antara zat metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman yang mungkin mempunyai efek biologis sebagai antibiotik adalah alkaloid, saponin, dan tanin (Mulyani *et al.*, 2022).

**e. Manfaat Tumbuhan**

*Passiflora foetida L.* sering digunakan sebagai obat alami untuk mengobati gatal-gatal, serta infeksi sistem pencernaan, kulit, tenggorokan, dan telinga, serta infeksi saluran kemih (Asadujjaman *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2013). Ini juga digunakan sebagai anti-inflamasi, analgesik, dan sitotoksik, serta antibakteri dan antimikroba (Paikrao, 2012).

**f. Senyawa Kimia**

1) Alkaloid



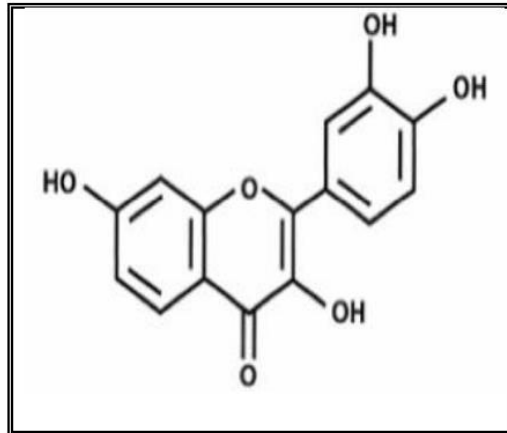
**Gambar 2. 2 Struktur Alkaloid** (Olipiya *et al.*, 2022)

Alkaloid merupakan kelompok metabolit sekunder yang penting dan dapat ditemukan dalam berbagai jenis tumbuhan. Alkaloid sering ditemukan dalam bentuk campuran dengan beberapa alkaloid utama dan beberapa alkaloid kecil menyertainya serta tidak berdiri sendiri. Alkaloid memiliki sifat polar yang berarti larut larut dalam pelarut polar (Julianto, 2019).

Alkaloid memiliki kemampuan menghambat sintesis peptidoglikan pada sel bakteri sehingga menghambat pembentukan lapisan dinding sel dengan baik. Karena dinding sel hanya menutupi membran sel dan tidak memiliki

peptidoglikan, gangguan sintesis peptidoglikan ini dapat menyebabkan pembentukan sel tidak sempurna dan menimbulkan efek antibakteri (Lestari *et al.*, 2017).

## 2) Flavonoid

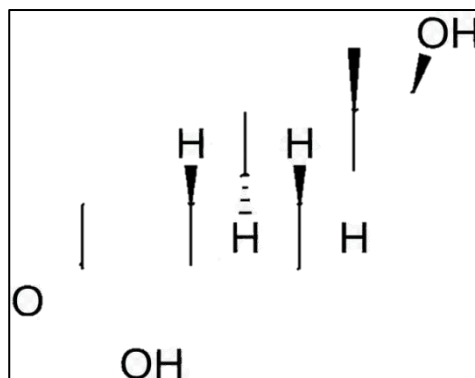


**Gambar 2. 3 Struktur Flavonoid** (Olipiya *et al.*, 2022)

Flavonoid yang ditemukan dalam beberapa tumbuhan telah terbukti memiliki sifat antibakteri. Mekanisme antibakteri flavonoid mampu mengganggu membran sitoplasma bakteri. Flavonoid dapat berinteraksi dengan membran bakteri, menyebabkan perubahan struktur dan fungsi membran. Proses ini dapat menghambat transpor nutrisi dan ion melintasi membran, mengganggu homeostasis seluler, dan mengganggu proses vital dalam mikroba. Selain itu flavonoid juga dapat mengganggu energi transduksi di membran sitoplasma bakteri, menghambat produksi ATP yang penting bagi kehidupan bakteri. Flavonoid juga dapat menghambat motilitas bakteri dengan menghambat sintesis flagel dan menghambat enzim yang terlibat dalam gerakan bakteri. Gugus hidroksil dalam struktur flavonoid dapat berkontribusi dengan komponen organik dalam sel bakteri, mengganggu fungsi enzim, dan menghambat aktivitas vital mikroba (Manik *et al.*, 2014).

Flavonoid adalah salah satu zat polar dengan jumlah gugus hidroksil yang banyak dalam komposisinya. Flavonoid larut dalam pelarut polar termasuk etanol, metanol, butanol, dan air karena adanya gugus hidroksil ini. Isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol termetoksilasi adalah beberapa bentuk flavonoid yang kurang polar. Karena struktur aglikon flavonoid ini kurang polar dibandingkan flavonoid yang memiliki hidroksil bebas mereka lebih mudah larut dalam pelarut nonpolar seperti eter dan kloroform (Olipiya *et al.*, 2022).

### 3) Steroid/Triterpenoid



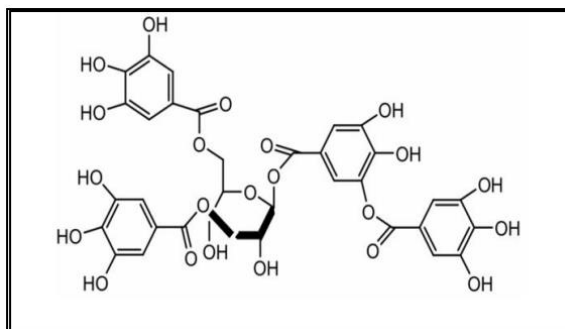
Gambar 2. 4 Struktur Steroid (Olipiya *et al.*, 2022)

Senyawa steroid dan triterpenoid termasuk dalam senyawa yang bersifat non polar. Steroid merupakan kelompok senyawa terpenoid lipid yang memiliki struktur dasar berupa empat cincin karbon. Struktur senyawa steroid sangat beragam dan tergantung pada gugus fungsional yang terikat pada cincin tersebut. Perbedaan struktur steroid terutama disebabkan adanya gugus fungsi yang teroksidasi dan ikatan rangkap pada cincin karbonnya. Triterpenoid juga termasuk kelompok senyawa non polar yang tergolong dalam keluarga terpenoid (Nasrudin, *et al.*, 2017).

Senyawa steroid atau triterpenoid memiliki cara untuk menghentikan perkembangan bakteri dengan

menghentikan pembuatan protein karena ia membangun dan memodifikasi unsur-unsur pembentuk sel bakteri (Noviyanti *et al.*, 2014).

#### 4) Tanin

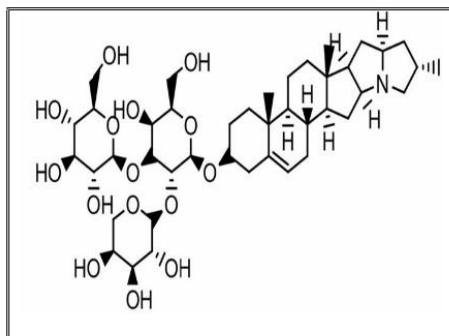


**Gambar 2. 5 Struktur Tanin** (Olipiya *et al.*, 2022)

Tanin adalah sekelompok molekul yang disebut polifenol yang terdapat pada tumbuhan berbeda. Telah diketahui bahwa tanin memiliki karakteristik polar dan larut dalam pelarut polar seperti etanol dan air. Tanin adalah nama lain untuk zat yang biasanya memiliki massa molekul lebih dari 1000 g/mol. Senyawa tanin memiliki kemampuan membentuk ikatan hidrogen dan dapat berinteraksi dengan protein dan membentuk kompleks tanin protein (Olipiya *et al.*, 2022).

Kelompok polifenol dari bahan kimia fenolik, yang dikenal sebagai kelompok tanin, dapat menyebabkan kerusakan sel dengan mendenaturasi protein antimikroba (Lestari *et al.*, 2017).

#### 5) Saponin



**Gambar 2. 6 Struktur Saponin** (Olipiya *et al.*, 2022)

Saponin adalah kelompok senyawa glikosida yang memiliki struktur aglikon yang disebut dengan sapogenin. Saponin ditemukan dalam berbagai tumbuhan dan memiliki sifat yang unik. Sifat saponin ialah kemampuannya untuk menurunkan tegangan permukaan air yang mengakibatkan terbentuknya busa atau buih saat saponin terpapar dengan air dan dikocok. Struktur saponin memiliki sifat amfifilik yang berarti memiliki bagian hidrofobik dan hidrofilik.

Saponin memiliki mekanisme dalam pembentukan biofilm. Senyawa saponin dapat berinteraksi dengan membran lipid bakteri, sehingga meningkatkan permeabilitas seluler sehingga menyebabkan terjadinya hemolisis sel. Membran sel adalah target lain dari potensi destruktif saponin. Ketika tegangan permukaan dinding sel bakteri rusak, bahan kimia antibakteri tambahan dapat dengan cepat masuk ke dalam sel dan mengganggu metabolisme sel, sehingga membunuh kuman di dalamnya (Anggraini *et al.*, 2022).

## **2. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah metode pemisahan komponen dan bahan kimia dari simplisia atau tumbuhan. Jenis dan komponen zat yang akan diekstraksi menentukan teknik ekstraksi yang akan digunakan (Mukhriani *et al.*, 2014). Proses ekstraksi bertujuan untuk mentransfer komponen kimia yang terkandung dalam simplisia ke dalam pelarut. Pada permulaannya, pelarut menembus lapisan luar dinding sel atau struktur tumbuhan tumbuhan lainnya untuk mencapai senyawa yang diinginkan. Setelah itu, komponen kimia yang larut dalam pelarut berdifusi keluar dari sel dan terjadi perbedaan tekanan antara lingkungan di luar sel dan di dalam sel. Dalam proses ekstraksi pemilihan pelarut juga penting karena pelarut yang sesuai dapat meningkatkan kelarutan dan ekstraksi

senyawa yang diinginkan. Sifat – sifat dan kimia senyawa yang akan diekstraksi seperti polaritas, kelarutan, dan afinitas terhadap pelarut mempengaruhi pilihan pelarut yang cocok. Metode ekstraksi yang tepat dan optimal dapat membantu memaksimalkan rendemen kualitas ekstrak yang dihasilkan. Maka, pemilihan metode ekstraksi yang tepat menjadi sangat penting dan penyesuaian parameter ekstraksi seperti waktu ekstraksi, rasio, bahan, solven, dan lainnya yang menjadi penting untuk mencapai hasil ekstraksi yang optimal (Mukhriani, 2014).

Tahapan-tahapan ekstraksi untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut:

- a. Menyortir, mengeringkan, dan menggiling bahan tanaman (daun, kelopak, dll.)
- b. Pemilihan pelarut
- c. Pelarut polar, termasuk metanol, etanol, dan air
- d. Pelarut semipolar, termasuk diklorometana dan etil asetat,
- e. Pelarut nonpolar, termasuk petroleum eter, kloroform, dan n-heksana (Mukhriani *et al.*, 2014)

Ada beberapa jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan, antara lain:

- a. Cara Dingin
  - 1) Maserasi

Maserasi adalah teknik ekstraksi langsung yang sering digunakan untuk menghilangkan bahan kimia dari simplisia. Proses ini dapat diterapkan baik secara komersial maupun dalam skala kecil. Serbuk simplisia dan pelarut yang sesuai digabungkan dalam wadah tertutup rapat dan dibiarkan pada suhu kamar selama proses maserasi. Seiring berjalannya waktu, zat-zat dalam simplisia akan larut dalam pelarut. Proses ekstraksi dapat dihentikan dan pelarut dapat disaring keluar dari sampel setelah keseimbangan tercapai antara konsentrasi bahan kimia dalam pelarut dan



konsentrasi dalam sel tumbuhan. Meskipun serbaguna dan mudah digunakan, proses maserasi memiliki beberapa kelemahan yang patut dipertimbangkan. Salah satunya adalah membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak dan membutuhkan waktu yang lama. Namun, metode maserasi dapat menghindari kerusakan senyawa yang termolabil karena tidak melibatkan suhu tinggi yang dapat menyebabkan degradasi senyawa tersebut (Mukhriani *et al.*, 2014).

## 2) Perkolasi

Dengan menggunakan perkolator (wadah berbentuk silinder dengan keran di bagian bawah), serbuk simplisia direndam dalam air secara bertahap. Cangkang sampel diletakkan di atas pelarut dan cairan dibiarkan menetes perlahan ke bawah. Sampel mendapat manfaat dari teknik perkolasi ini karena sampel terus direndam dalam pelarut segar. Pendekatan perkolasi mempunyai kelemahan, antara lain memerlukan waktu yang lama, menggunakan banyak pelarut, dan tidak efektif jika sampel dalam perkolator tidak seragam (Mukhriani *et al.*, 2014).

## b. Cara Panas

### 1) Soxhlet

Metode Soxhlet adalah peralatan Soxhlet digunakan untuk melakukan proses ekstraksi. Siklus ekstraksi kontinyu diulangi untuk menyelesaikan proses ekstraksi menggunakan teknik Soxhlet. Teknik Soxhlet menawarkan sejumlah keuntungan, termasuk penggunaan pelarut kondensasi murni, yang membutuhkan pelarut yang relatif lebih sedikit, dan proses ekstraksi yang berkesinambungan. Selain itu, teknik ini juga mampu mencapai efisiensi ekstraksi yang besar. Namun demikian, terdapat sejumlah kelemahan termasuk fakta bahwa senyawa termolabil mungkin pecah

atau rusak seiring berjalannya waktu akibat paparan terus-menerus terhadap titik didih pelarut. (Mukhriani *et al.*, 2014).

## 2) Reflux dan Destilasi Uap

Metode reflux dan destilasi uap adalah metode ekstraksi yang melibatkan pemanasan sampel dengan pelarut dalam kondisi tertutup menggunakan kondensor. Sampel dan pelarut digabungkan dalam labu dan dihubungkan oleh kondensor dalam prosedur refluks. Setelah pelarut dipanaskan hingga titik didih, uap yang dihasilkan mengembun di kondensor dan kembali ke laboratorium. Mengulangi prosedur ini memungkinkan untuk mengekstraksi bahan kimia yang larut dalam pelarut.

Metode destilasi uap serupa dengan metode reflux, namun lebih umum digunakan dalam ekstraksi minyak atsiri. Pada metode ini, campuran senyawa menguap seperti minyak atsiri, dipanaskan dalam labu ukur dengan pelarut. Uap yang terbentuk akan terkondensasi di kondensor dan destilat yang terdiri dari senyawa yang tidak bercampur dikumpulkan di tempat yang terpasang kondensor. Kelemahan dari metode ini adalah kestabilan senyawa yang labil. Pemanasan yang berkepanjangan atau suhu tinggi dapat mengakibatkan degradasi atau reduksi senyawa yang labil. Oleh karena itu, dalam penggunaan metode ini perlu mempertimbangkan suhu dan waktu pemanasan yang tepat untuk menjaga stabilitas senyawa yang diinginkan (Mukhriani *et al.*, 2014).

## 3. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan tahapan kedua setelah proses ekstraksi yang melibatkan pemisahan dan pengumpulan senyawa kimia dalam ekstrak berdasarkan kepolarannya. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan campuran senyawa menjadi

beberapa fraksi yang memiliki karakteristik polaritas yang berbeda (Mukhriani *et al.*, 2014).

Fraksinasi memiliki beberapa jenis metode seperti berikut :

a. Metode Ekstraksi Cair-cair

Metode ekstraksi cair – cair adalah suatu teknik ekstraksi yang menggunakan dua pelarut berbeda yang dipisahkan. metode ini juga dikenal dengan ekstraksi fase padat – cair atau ekstraksi pelarut – partisi. Prinsip dasar metode ekstraksi cair – cair adalah perbedaan kelarutan atau afinitas analisis terhadap pelarut polar dan pelarut nonpolar atau semi polar. Analit yang mudah diekstraksi dalam pelarut biasanya adalah molekul netral yang memiliki substituen yang bersifat nonpolar atau semipolar sehingga memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap pelarut organik daripada air. Setelah pencampuran, kedua lapisan pelarut dipisahkan. Analit yang diinginkan akan terkandung dalam pelarut organik, Sedangkan zat yang mudah terionisasi dan bersifat polar akan tetap berada pada fasa air (Herdiana & Aji, 2020).

b. Kromatografi Kolom (KK)

Kromatografi kolom adalah proses pemisahan preparatif digunakan untuk memisahkan campuran berdasarkan gram beratnya. Metode ini berdasarkan pada prinsip adsorpsi dimana komponen dalam sampel akan terikat pada fase diam berupa adsorben. Cara kerja kromatografi kolom dimulai dengan mengisi kolom dengan fase diam berupa adsorben yang biasanya berbentuk partikel kecil yang memiliki sifat adsorpsi terhadap senyawa yang akan dipisahkan. Sampel yang akan dipisahkan kemudian diaplikasikan pada kolom dan larut dalam eluen, yaitu pelarut yang digunakan untuk menggerakkan sampel melalui kolom. Saat eluen dialirkan melalui kolom, senyawa – senyawa dalam sampel akan berinteraksi dengan fase diam adsorben. Senyawa dengan kekuatan interaksi yang lebih tinggi akan

terikat dengan lebih kuat pada adsorben dan akan melakukan migrasi lebih lambat melalui kolom sedangkan senyawa dengan interaksi yang lebih lemah akan bergerak lebih cepat (Herdiana & Aji, 2020).

c. *Size – Exclusion Chromatography* (SEC)

Metode fraksi *Size – Exclusion Chromatography* (SEC) atau juga dikenal sebagai *Gel Permeation Chromatography* (GPC) didasarkan pada prinsip pemisahan berdasarkan ukuran berat molekul. Metode ini digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan ukuran molekul mereka. Prinsip kerja SEC adalah analit melewati kolom yang berisi fase diam berpori, yang sering kali berupa partikel gel. Partikel gel ini memiliki pori – pori dengan ukuran tertentu. Molekul dengan ukuran yang lebih besar tidak dapat memasuki pori pori fase diam dan bergerak lebih cepat melalui kolom. SEC dapat digunakan untuk memisahkan berbagai jenis senyawa berdasarkan ukuran molekul, termasuk polimer, protein, dan makromolekul lainnya. Metode ini juga dapat digunakan dalam medium berair (kromatografi permeasi gel) atau dalam pelarut organik (kromatografi filtrasi gel). Dalam medium tidak berair, salah satu jenis gel yang umum digunakan adalah *Sephadex* LH-20, yang memiliki rentang ukuran pori tertentu untuk memfasilitasi pemisahan berdasarkan berat molekul (Herdiana & Aji, 2020).

#### 4. Pelarut

Pelarut ekstraksi dapat digunakan untuk menghilangkan komponen tanaman yang diinginkan. Tergantung pada karakteristik molekul kimia yang diekstraksi dan pelarut yang digunakan, pemilihan pelarut yang tepat sangat penting untuk efektivitas proses ekstraksi. Kemanjuran prosedur ekstraksi juga dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan dan kualitasnya. Polaritas senyawa dalam pelarut merupakan faktor kunci dalam proses ekstraksi.

Hanya pelarut polar seperti etanol, butanol, atau air yang dapat melarutkan senyawa polar. Senyawa non-polar dapat dilarutkan dalam larutan berair pelarut non-polar seperti eter, kloroform, atau n-heksana.

Likopen, steroid, triterpenoid, dan sejumlah kecil karotenoid dapat diekstraksi menggunakan pelarut non-polar seperti n-heksana, sedangkan pelarut polar seperti metanol dan etanol digunakan untuk mengekstrak alkaloid, flavonoid, tanin, xanthin, dan bahan kimia polar lainnya. Sementara itu, zat-zat termasuk likopen, b-karoten, vitamin C, padatan terlarut, dan total fenol dapat tertarik pada pelarut semi polar seperti etil asetat. Pelarut yang digunakan harus murah, tidak beracun, mudah terbakar, dan mampu melarutkan bahan sasaran dengan titik didih rendah (Kasminah, 2016).

## **5. Biofilm**

### **a. Definisi**

Biofilm adalah lapisan yang menempel pada suatu permukaan dan terdiri dari sekelompok mikroorganisme. Matriks polimer ekstraseluler yang dibuat bakteri membentuk biofilm yang melekat. Mikroba pada lapisan biofilm, terutama yang berada pada permukaan bahan lembab dan kaya nutrisi, mempunyai kecenderungan untuk berkembang biak dan berkembang dengan cepat hingga membentuk koloni (Chaerunisa, 2015).

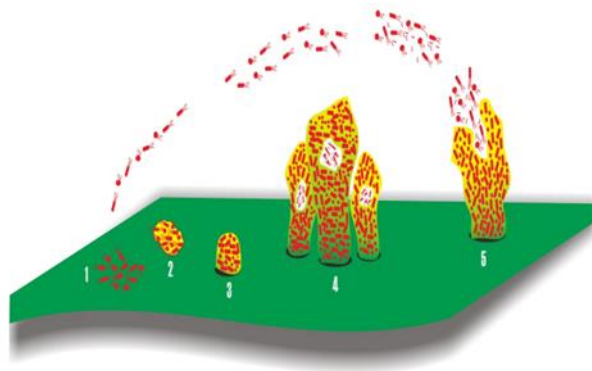
Biofilm dapat bertindak sebagai perisai, melindungi mikroorganisme di dalamnya dari sistem kekebalan sel inang dan membuatnya resisten terhadap antimikroba standar. Ketika jumlah sel inang yang terinfeksi meningkat selama infeksi klinis, biofilm terbentuk dan meningkatkan virulensi dan resistensi. Kehadiran serum dan air liur di lingkungan dapat mendorong perkembangan biofilm (Hamzah, 2021).

## **b. Struktur biofilm**

Mikrokoloni adalah unit struktural biofilm, dan interaksi fisiologis mikrokoloni dalam biofilm dewasa dapat dijelaskan oleh proses dasar pembentukan biofilm dari mekanisme penginderaan kuorum, resistensi antimikroba, dan perlekatan substrat. Agregat sel bakteri menghasilkan sekitar 15% volume biofilm, sedangkan bahan matriks menyumbang 85% dari total volume. *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) dapat dianggap sebagai bahan matriks utama, yang menyumbang 50% hingga 90% karbon organik dalam biofilm. Meskipun susunan fisik dan kimianya bervariasi, polisakarida merupakan mayoritas EPS. Karena dapat mengikat banyak air dengan derajat kelarutan yang berbeda-beda, EPS bersifat hidrofilik (Hamzah, 2021).

## **c. Mekanisme pembentukan**

Gambar 2.7 mengilustrasikan lima langkah proses pembuatan biofilm. Gaya *Van der Waals* menyebabkan sel-sel bakteri menempel satu sama lain pada permukaan substrat selama tahap pertama. Pada langkah pertama, sel-sel bakteri masih terhubung sementara. Namun, pada tahap kedua, komponen perekat yang lebih kuat yang disebut bahan eksopolimer terbentuk, yang secara permanen melekatkan sel bakteri. Tahap ketiga ditandai dengan munculnya mikrokoloni dan dimulainya perkembangan biofilm. Sementara itu, semakin banyak biofilm yang terbentuk pada tahap keempat, yang menghasilkan struktur tiga dimensi dengan sel-sel yang dilapisi dalam banyak kelompok yang saling berhubungan satu sama lain. Dispersi sel yang terjadi pada langkah terakhir pembuatan biofilm, memungkinkan sel melepaskan diri dari biofilm, menempel pada substrat baru, dan membuat biofilm baru (Hamzah, 2021).



**Gambar 2. 7 Proses Pembentukan Biofilm** (Hamzah, 2021)

Keterangan :

- 1) Sel bakteri menempel sebentar pada permukaan.
- 2) Produksi zat eksopolimer.
- 3) Biofilm mulai berkembang dan mikrokoloni mulai tumbuh.
- 4) Semakin banyak biofilm yang tercipta.
- 5) Terjadi dispersi sel, memungkinkan sel melakukan perjalanan dan membuat biofilm baru.

#### **d. Peran biofilm terhadap mikroba**

Biofilm memiliki peran terhadap mikroba yaitu:

##### 1) Nutrisi

Berbeda dengan sel planktonik, bakteri dalam biofilm terlibat dalam proses metabolisme yang berbeda. Bakteri dalam biofilm memiliki sedikit oksigen dan sedikit akses terhadap nutrisi.

##### 2) Variasi genetik

Namun, rekayasa genetika mikroorganisme memungkinkan terjadinya transfer gen antar populasi, sehingga menimbulkan kekhawatiran serius mengenai munculnya bakteri yang resisten terhadap antibiotik.

##### 3) Perlindungan

Ekspolisakarida adalah molekul ekstra-polimer penting yang disekresikan oleh bakteri. Tanpa mengurangi akses bakteri terhadap nutrisi, matriks ini melindungi bakteri dari pengaruh

faktor eksternal seperti perubahan suhu, pergerakan osmotik, radiasi UV, dan pengeringan (Hamzah, 2021).

#### **e. Fungsi biofilm dan peranannya terhadap resistensi bakteri**

Pertumbuhan bakteri ditingkatkan dan mekanisme pertahanan didukung oleh penciptaan biofilm. Berdasarkan empat peran yang dimainkan biofilm, berikut ini :

##### 1) Pertahanan

Biofilm adalah mekanisme pertahanan bakteri yang membantu kuman agar tidak terbunuh oleh hal-hal seperti fagositosis sel kekebalan, antibiotik, dan pembentukan sel bakteri yang tidak patuh. Bakteri pembentuk biofilm 10.000-1.000 kali lebih tahan dibandingkan bakteri non-biofilm.

##### 2) Pelekatan

Bakteri dapat menempel pada permukaan yang kaya nutrisi seperti jaringan hewan atau permukaan substrat dalam sistem aliran seperti permukaan batuan dalam air mengalir ketika terdapat biofilm.

##### 3) Kolonisasi

Ketika bakteri menghasilkan biofilm, mereka dapat tetap berdekatan dan membentuk koloni. Menggunakan kemampuannya untuk berkembang biak, berkolonisasi, dan membangun biofilm, *S. typhi* mampu berkomunikasi dengan sel inang dan memberi sinyal pada molekul, sehingga membuka pintu bagi pertukaran genetik.

##### 4) Cara hidup alami bakteri

Biofilm adalah cara hidup normal untuk beberapa bakteri yang timbul dari pemberian makanan yang tidak memadai ketika bakteri tidak dapat menempel (Fadly, 2019).

#### **f. Resistensi Biofilm terhadap antibiotik**

Biofilm adalah suatu komunitas bakteri yang terikat pada permukaan dan dikelilingi oleh matriks ekstraseluler polimerik



(EPS). Resistensi antibiotik pada bakteri umumnya lebih tinggi pada biofilm dibandingkan pada bentuk planktonik atau tersebar. Banyak hal yang mungkin menjadi penyebabnya.

Salah satu faktor utama yang menyebabkan resistensi antibiotik dalam biofilm adalah matriks EPS. Matriks ini terdiri dari polisakarida, protein, dan asam nukleat, yang membentuk struktur pelindung di sekitar bakteri dalam biofilm. Matriks EPS ini berperan sebagai penghalang fisik yang menghambat penetrasi antibiotik ke dalam biofilm. Antibiotik kesulitan untuk mencapai sel bakteri yang terlindungi dalam biofilm, sehingga efektivitas antibiotik itu berkurang.

Selain dari itu, transfer gen horizontal atau *Horizontal Gene Transfer* (HGT) juga dapat meningkatkan resistensi antibiotik dalam biofilm. Beberapa bakteri dalam biofilm dapat mengalami mutasi genetik pada plasmid, yang merupakan fragmen DNA kecil yang berpindah antar spesies bakteri. Plasmid ini dapat dengan mudah dipindahkan ke sel bakteri lain dalam biofilm melalui transfer gen horizontal. Proses ini memungkinkan terjadinya penyebaran resistensi antibiotik di antara bakteri dalam biofilm.

Kondisi lingkungan di dalam biofilm juga bisa mempengaruhi resistensi antibiotik. Pasokan oksigen dan nutrisi biofilm yang terbatas, terutama pada tingkat terendah, memperlambat proliferasi, perkembangan, dan metabolisme sel. Antibiotik yang menargetkan pembelahan sel atau proses metabolisme aktif tidak akan mempengaruhi bakteri di tingkat terdalam biofilm karena mereka kurang efisien secara metabolik. Selain itu, ada subpopulasi sel dalam biofilm yang disebut dengan sel persisten. Sel – sel ini memiliki laju pertumbuhan yang sangat lambat atau bahkan nol. Mereka mampu bertahan dalam keadaan buruk, seperti terkena antibiotik. Antibiotik umumnya bekerja dengan cara mengganggu proses vital dalam

sel bakteri yang sedang aktif, seperti pembelahan sel atau sintesis protein. Oleh karena itu, persisten dalam biofilm cenderung tidak terpengaruh oleh antibiotik.

Bakteri dalam biofilm juga dapat mengeluarkan toksin, termasuk antibiotik keluar dari sel. Ini dapat memberikan keuntungan dalam melawan bakteri lain yang bersaing dalam biofilm, serta dapat membantu dalam mempertahankan komunitas biofilm yang stabil. Secara keseluruhan, resistensi antibiotik dalam biofilm adalah hasil dari interaksi kompleks antara matriks EPS, transfer gen horizontal, kondisi lingkungan, keberadaan sel persisten, dan kemampuan bakteri untuk mengeluarkan toksin (Abidah, 2020).

#### **g. Uji pembentukan biofilm**

##### **1) Metode Tabung**

Metode tabung adalah salah satu teknik kuantitatif langsung untuk mengidentifikasi dan menilai perkembangan biofilm. Dalam metode tabung ini ada beberapa tahap umum yang dilakukan. Pertama dimasukkan media pertumbuhan bakteri yang sesuai ke dalam tabung reaksi yang sesuai dengan ukurannya dan yang sudah disterilkan. Untuk media nya harus mendukung pertumbuhan bakteri yang ingin diuji. Diinokulasi biofilm dengan menambahkan bakteri yang diinginkan ke dalam tabung reaksi. Bakteri dapat diambil dari kultur murni atau sampel lingkungan yang mengandung bakteri yang ingin diuji. Inkubasi tabung reaksi pada suhu dan waktu yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri yang digunakan. Suhu inkubasi adalah suhu optimal bagi bakteri yang diuji dan waktu inkubasi dapat bervariasi tergantung pada jenis bakteri dan kecepatan pertumbuhannya. Setelah diinkubasi, perhatikan bagian dasar dan dinding tabung jika terbentuk biofilm, akan terlihat adanya garis atau lapisan pada dinding tabung dan di dasar tabung. Jumlah dan ketebalan biofilm dapat bervariasi tergantung

pada tingkat pembentukan biofilm oleh bakteri yang diuji. Jumlah pembentukan biofilm diberi nilai dengan skala angka 1-3. Skor angka 1 jika tidak ada atau biofilm yang sangat lemah terbentuk, skor 2 jika ada biofilm sedang terbentuk, dan skor 3 jika biofilm yang kuat atau tinggi terbentuk (Abidah, 2020)

## 2) Metode *Congo Red Agar*

Metode *Congo Red Agar* (CRA) adalah teknik untuk mendeteksi biofilm secara kualitatif dengan memantau perubahan warna pada koloni bakteri. Dengan menggunakan 37 g/L *Brain Heart Infusion Broth* (BHI), 50 g/L sukrosa, 10 g/L agar nomor 1, dan 8 g/L indikator CRA, kami membuat media CRA. Letakkan bakteri uji pada cawan petri yang diberi media CRA. Campuran kemudian diinkubasi secara aerobik selama 24 jam pada suhu 37°Celsius. Perhatikan perubahan warna koloni bakteri setelah inkubasi. Koloni biofilm yang terbentuk berwarna gelap dan terasa seperti kristal kering. Warna hitam tersebut disebabkan interaksi antara bakteri, sukrosa, dan indikator CRA yang terkandung dalam media CRA. Jika tidak membentuk biofilm maka koloni memiliki warna pink atau merah (Abidah, 2020).

## 3) Metode *Microtiter plate* (MtP)

Metode *microtiter plate* adalah dalam hal identifikasi biofilm, teknik kuantitatif adalah standar terbaiknya. Dengan penggunaan *microplate reader* (microELISA), teknik ini memungkinkan pengukuran kuantitatif. Kemanjuran agen antibiofilm terhadap biofilm bakteri juga dapat dievaluasi dengan menggunakan teknik ini. Manfaatkan kontrol negatif kosong yang memiliki media di dalamnya. Nilai OD digunakan untuk mendeteksi isolat yang sedang membentuk biofilm. membandingkan nilai OD sampel dengan nilai kontrol negatif.

Isolat dikatakan sebagai pembentuk biofilm jika nilai OD-nya melebihi blanko (Abidah, 2020).

## **h. Uraian Mikroba Pembentuk Biofilm**

### **1) *Pseudomonas aeruginosa***

#### a) Klasifikasi

Domain	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Bangsa	: Pseudomonadales
Suku	: Pseudomonadaceae
Marga	: Pseudomonas
Jenis	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Irwan, 2017)

#### b) Sifat dan morfologi

*Pseudomonas aeruginosa* batang berbentuk sel soliter yang bisa lurus atau melengkung tetapi tidak heliks. Pengukurannya berkisar antara 0,5 hingga 1,0  $\mu\text{m}$ . Dapat beradaptasi dengan flagel kutub, baik mono atau multi kaya. tidak membuat selongsong untuk prostetik. Tidak ada tahap istirahat yang diketahui. Kemopatogen. metabolisme melalui pernapasan; fermentasi tidak pernah terlibat. Beberapa mempunyai kemampuan untuk menggunakan  $\text{H}_2$  sebagai sumber energi dan bersifat kemolitotrof fakultatif. Karena oksigen molekuler dapat mengambil elektron dari sumber manapun, nitrat adalah penerima yang umum untuk proses denitrifikasi.

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah contoh bakteri oportunistik gram negatif yang sering berkontribusi pada pengembangan biofilm pada perangkat medis intrabody. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* bertanggung jawab atas sekitar 10-20% dari seluruh infeksi nosokomial. Infeksi yang disebabkan oleh

bakteri pembentuk biofilm *Pseudomonas aeruginosa* sangat sulit untuk dihilangkan dan terkadang menyebabkan kondisi yang persisten atau kronis, seperti pada kasus infeksi paru pada penderita fibrosis kistik atau infeksi biofilm yang disebabkan oleh penggunaan instrumen yang ditanamkan ke dalam tubuh. tubuh. Pasalnya, bakteri pembentuk biofilm lebih resisten terhadap antibiotik dan sistem imun tubuh dibandingkan kuman planktonik (Setiyawan, 2017).

## 2) *Escherichia coli*

### a) Klasifikasi

Domain	: Bacteria	
Filum	: Proteobacteria	
Kelas	: Gammaproteobacteria	
Suku	: Enterobacteriales	
Marga	: Escherichia	
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>	(Irwan, 2017).

### b) Sifat dan morfologi

*Escherichia coli* adalah batang lurus berukuran 1,1–1,5 µm kali 2,0–6,0 µm, bakteri gram negatif dapat bersifat non-motil atau motil dengan flagel peritrichous. mudah berkembang pada media nutrisi dasar. Meskipun strain tertentu mungkin tidak memfermentasi glukosa dan maltosa, sebagian besar strain memfermentasi laktosa, menghasilkan gas dan asam dalam prosesnya. berkembang paling baik pada suhu 37°C dan ditemukan di usus hewan (Setiyawan, 2017).

*Escherichia coli* merupakan strain bakteri gram negatif yang dapat menyebarkan penyakit ke beberapa organ (Widianingsih & de Jesu, 2018). Terdapat bukti bahwa beberapa strain E. coli kebal terhadap banyak kelas

antibiotik (Al-Shabib et al., 2017; Hilda, 2017; Moradigaravand et al., 2018; Sumampouw, 2018; Jihan, 2019). Proses penyembuhan akan melambat dan akibatnya biaya terapi akan meningkat (Jihan, 2019; Widianingsih & de Jesus, 2018). *E. coli* dapat mengembangkan resistensi terhadap antibiotik karena sejumlah mekanisme yang berbeda, termasuk mutasi spontan yang disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak tepat (Widianingsih & de Jesus, 2018) dan kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm (Fajrin., 2020). Resistensi antibiotik telah dikaitkan dengan kapasitas bakteri untuk menghasilkan biofilm (Wahyudi et al., 2019; Cepas et al., 2019; Viana et al., 2020), menurut beberapa penelitian.

#### **i. Antimikroba**

Antimikroba adalah bahan kimia atau obat-obatan, seperti antibiotik, antiseptik, desinfektan, dan pengawet, yang digunakan untuk mengobati infeksi mikrobiologis pada manusia. Kategori ini akan terhubung dengan industri farmasi. Selain itu, antibiotik adalah obat yang menghancurkan mikroorganisme, terutama yang mengancam kesehatan manusia. Mikroorganisme yang tidak termasuk dalam kelompok parasit merupakan satu-satunya mikroba yang dipertimbangkan dalam hal ini.

Efek bakteristatik dan bakteriosidal merupakan karakteristik agen antimikroba. Agen yang mencegah atau menghentikan pertumbuhan mikroorganisme, kadang-kadang disebut bakteri, dikenal sebagai bakteristatik. Karena mereka tidak mampu berkembang biak atau bereproduksi, populasi mikroorganisme dalam keadaan ini menjadi stagnan. Sebaliknya, bahan atau senyawa yang disebut bakteriosida memiliki kemampuan untuk menghancurkan bakteri. Mikroorganisme (bakteri) yang dimaksud kemudian tidak dapat berkembang biak

atau berkembang biak, dan jumlahnya akan menurun atau bahkan habis.

Antimikroba diklasifikasikan menjadi spektrum sempit atau spektrum luas tergantung pada mikroorganisme target yang dituju. Antibiotik dengan spektrum sempit hanya dapat membunuh atau menghambat jenis bakteri tertentu, seperti bakteri Gram negatif saja atau Gram positif saja. Antimikroba yang efektif melawan bakteri gram negatif dan gram positif dikatakan mempunyai spektrum yang luas (Setiyawan, 2017).

Aktivitas antibakteri dapat diukur dengan dua cara berbeda, sebagai berikut:

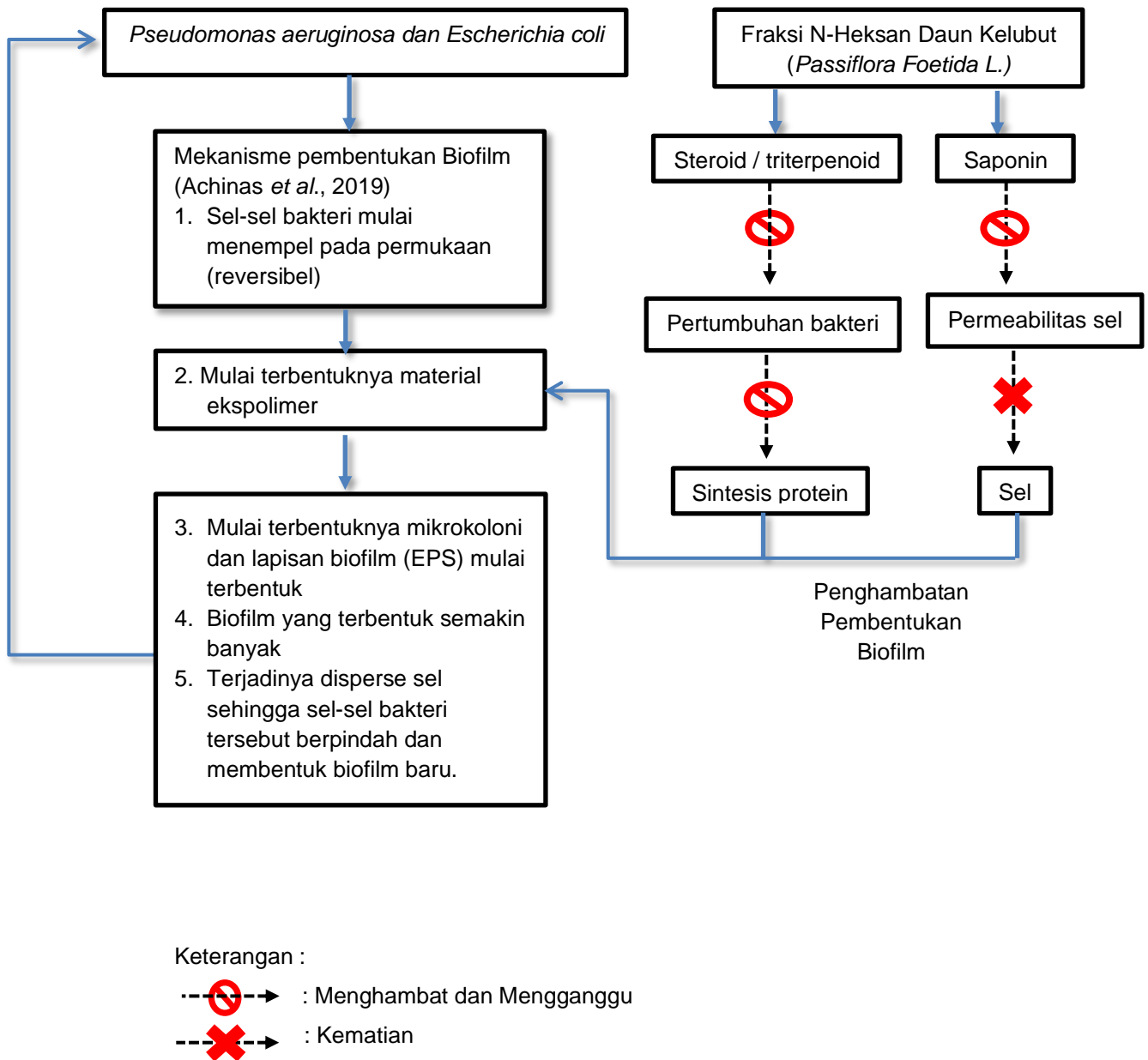
1) Metode dilusi

Konsentrasi agen antimikroba yang berbeda dimasukkan ke dalam media cair. Media tersebut diinkubasi dan segera disuntik dengan bakteri. Menemukan dosis terendah dari agen antibakteri yang dapat menghentikan pertumbuhan kuman uji atau membasminya adalah tujuan dari percobaan ini.

2) Metode difusi

Dalam teknik difusi agar, biasanya digunakan cakram kertas, vakum kaca, dan pencetak lubang. Teknik ini didasarkan pada konsep pengukuran zona hambat pertumbuhan bakteri yang disebabkan oleh difusi zat antibakteri dalam medium padat melalui suatu reservoir. Pertumbuhan bakteri dicegah di wilayah bening di sekitar cakram. Dengan kata lain, wilayah resistensi tumbuh berbanding lurus dengan potensi zat antibakteri yang digunakan.

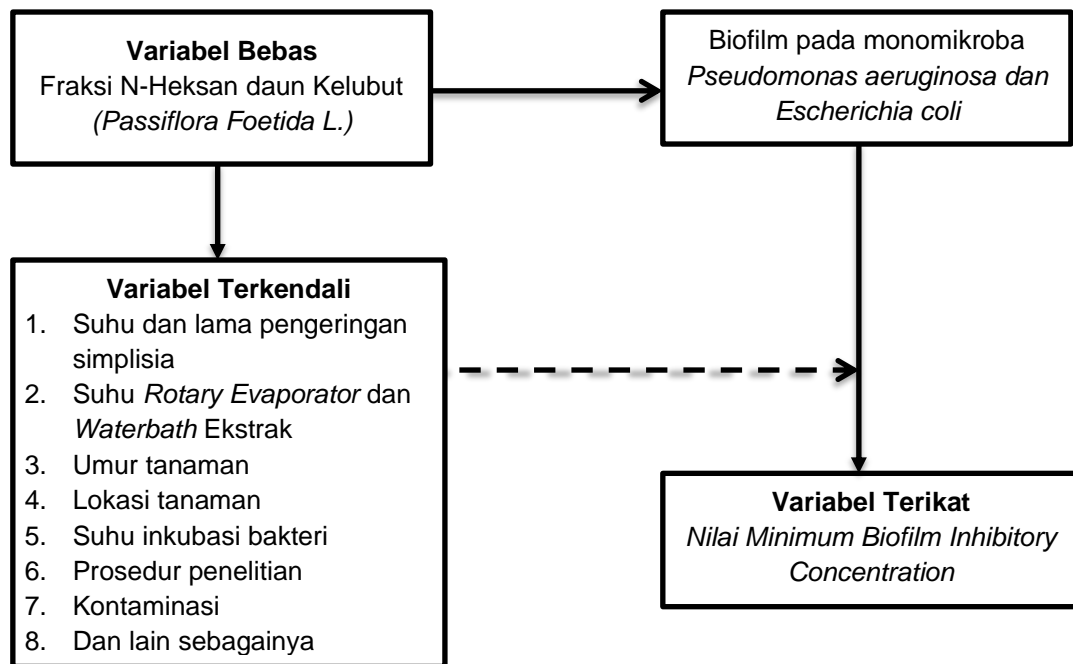
## B. Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2. 8 Kerangka Teori Penelitian



### C. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2. 9 Kerangka Konsep Penelitian

### D. Hipotesis

Fraksi N-Heksan daun kelubut (*Passiflora foetida L.*) memiliki aktivitas penghambatan biofilm terhadap bakteri monomikroba *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.